Beiträge zur Gramfärbung.

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen medizinischen Fakultät

der

Grossherzoglich Badischen
Ruprecht-Karls-Universität in Heidelberg

vorgelegt von

Fritz Reichert
aus Lissa (Bez. Posen).

Heidelberg
Buch- und Kunstdruckerei Rößler & Herbert
1913.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Heidelberg

Dekan
Prof. Dr. M. Wilms.

Referent
Professor Dr. H. Kossel.

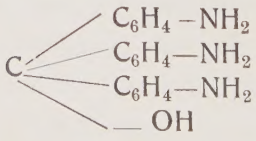
1913.

Gram machte bei seinen Arbeiten über Bakterien — Kontrastfärbungen in Gewebsschnitten im Jahre 1884 die Entdeckung, dass in jodierten, mit Gentiana-Violett gefärbten Präparaten von Pneumonie-Lungen bei Entfärbung durch Alkohol die Kokken den Farbstoff festhielten, während sich das Gewebe entfärbte. Weitere Studien des eigentümlichen Verhaltens der Spaltpilze zeigten, dass ein Teil von ihnen dieselbe Bindungskraft besitzt wie die Pneumokokken, die anderen aber nicht. Daraus ergab sich die Trennung in grampositive und gramnegative Bakterien. Als Farbstoff hatte sich bei allen diesen Experimenten nur das Gentiana-Violett als brauchbar erwiesen. Später stellte Unna deshalb Versuche darüber an, worauf dies eigentliche Verhalten des Gentiana-Violetts beruhe.

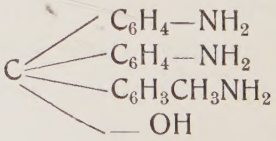
In jener Arbeit, in der Unna seine Ergebnisse niederlegte, und die die grundlegende und bis jetzt unbestrittene für die Beziehungen der Farbstoffe zur Gramfärbung geblieben ist, kommt er zu dem Ergebnis, dass der Lepra-Erreger in Gewebsschnitten — mit denen er fast alle seine Versuche anstellte — bei Anwendung jodierter Rosaniline sich als Stäbchen, bei Färbung mit jodierten Pararosanilinen aber als Kokkenreihe darstellt. Er führt dies unterschiedliche Verhalten darauf zurück, dass die nur wenig feste Rosanilin-

Jodverbindung durch den Alkohol gelöst und dann das Jod ausgeschwemmt werde, während der Farbstoff diffus verteilt zurückbleibe. Die Pararosaniline aber gingen mit dem Jod eine sehr feste Verbindung ein, die vom Alkohol nicht gelöst werde und die besonders fest in den „Kokken“ hafte. Er ist demnach der Meinung, dass bei jodierten Rosanilinen das Jod ausgewaschen wird, während die feste Jodpararosanilin-Verbindung ungespalten haften bleibt. Daraus kann man den allgemeinen Satz ableiten, dass nur die Pararosaniline zur Gramfärbung brauchbar sind, die Rosaniline aber nicht, da die Jodierung auf ihr Haften ohne Einfluss ist. Die meisten Autoren haben auch diese Folgerung daraus gezogen, während Unna damals diesen verallgemeinernden Schluss nicht machte! Er sieht nur in diesem Verhalten der Rosaniline und Pararosaniline eine überaus feine und charakteristische chemische Reaktion der Bakterienzelle mit dem betreffenden Farbstoff, die besonders bemerkenswert sei bei der sehr ähnlichen Konstitution beider Körper.

Beide, Rosaniline und Pararosaniline, sind Triamido-Triphenylmethanfarben und unterscheiden sich nur durch die dem Rosanilin eingefügte Toluylgruppe, so dass die Konstitutionsformeln beider folgendermassen zusammengesetzt sind:



Pararosanilin.



Rosanilin.

So ist das Gentiana-Violett und Viktoriablau ein phenyliertes, das Methylviolett und Kristall-Violett ein methyliertes, das Aethyl-Violett ein äthyliertes Pararosanilin, während das Fuchsin das salzsaure Salz des Rosanilins ist.

Den experimentellen Beweis für die von ihm vertretene Anschauung von der Unbeeinflussbarkeit der Rosaniline durch Jod aber erbringt Unna nicht, denn dann hätte er zeigen müssen, dass sich jodierte und unjodierte Rosanilinpräparate bei der Nachbehandlung mit Alkohol gleichmässig verhalten.

Bei der Wichtigkeit der Gramschen Reaktion für die Bakterien-Diagnostik ist es aber entschieden wertvoll, Klarheit darüber zu besitzen, ob eine Beeinflussung der Rosaniline durch Jod in ihrem färberischen Verhalten stattfindet oder nicht. Es wurden deshalb zur Erforschung dieser Verhältnisse Versuche über die Wirkung des Jod zunächst auf Anthraxpräparate, die mit Fuchsin behandelt waren, angestellt.

Ueber die im folgenden beschriebenen Färbungen ist kurz zusammenzufassen: Alle Färbungen wurden, soweit nicht ausdrücklich etwas anderes bemerkt ist, 16 h im Brutschrank bei 37° vorgenommen. Es war dies erforderlich, um die Resultate verschiedener Methoden gut miteinander vergleichen zu können. Bei Flammenfärbung ist es ganz unmöglich, genau dosierte Hitzewirkungen zu erzielen.

Die Lösungen aller im folgenden benutzten Farbstoffe wurden derart hergestellt, dass koncentriert alkoholische Lösungen des Farbstoffs im Verhältnis von 10:100 mit 2%igem Carbolwasser gemischt wurden. Nur bei Auramin wurde ein Verhältnis von 20:100 Carbolwasser angewandt.

Als Lichtquelle für alle mikroskopischen Untersuchungen diente eine von Zeiss konstruierte Nernstlampe. Es lag dies im Interesse eines genauen Vergleichs der Farbtöne. Denn es ist nicht gleichgültig, ob man einmal bei hellerem oder dunklerem Tageslicht und dann wieder bei Lampenlicht untersucht.

Es zeigte sich, dass sich bei der Entfärbung der mit Fuchsin imprägnierten Präparate durch Alkohol, Acetonalkohol und 3% HCl - Alkohol ein Unterschied im Verhalten der jodierten und nicht jodierten Ausstriche nicht finden liess. Durch die Einwirkung des Alkohols oder Aceton-Alkohols werden beide kaum merklich entfärbt, während ihnen der HCl-Alkohol das Fuchsin fast vollkommen entzieht. Ein ganz prägnanter Unterschied im Aussehen der mit Jod behandelten und der nicht der Jodwirkung ausgesetzten tritt jedoch hervor, wenn man nach der Färbung eine Minute mit 5% Salpetersäure und 10 Sek. mit 3% Salzsäure behandelt und dann mit Alkohol oder Acetonalkohol extrahiert. Jetzt erscheinen die unjodierten Fuchsinpräparate hellrot und stellenweise farblos, während die jodierten eine tiefdunkelrote Färbung aufweisen. Diese feste Bindung kann nur eine Wirkung des Jods sein und widerspricht aufs schärfste Unnas Ansicht von der sofortigen Auswaschung des Jods bei Rosanilinen. Dazu bedarf es vielmehr der Einwirkung des 3% HCl-Alkohols. Diesen Resultaten gegenüber könnte eingewandt werden, dass eventuell durch die Säurewirkung eine festere Bindung zwischen Jod und Rosanilin zustande käme. Das ist aber höchst unwahrscheinlich,

denn der HCl-Alkohol, der auch zu 3 % HCl enthält, zeitigt im Gegenteil eine stark entfärbende Wirkung.

Nach diesen Erfahrungen war es interessant zu wissen, eine wie starke Einwirkung zur Lösung der offenbar festeren Jodpararosanilinverbindung nötig sei. Auch hier konnte die Grenze nachgewiesen werden. Entfärbt man mit Methylviolett imprägnierte Anthrax-präparate, die teils jodiert teils unjodiert sind, mit Säuren und dann 24 h. mit Acetonalkohol, so haben beide Arten das gleiche blass-violette Aussehen, ohne dass das Jodierte noch eine Spur von dem typischen schwarz-violetten Ton der Grampositiven zeigte. Unter diesen Bedingungen wird also auch das jodierte Pararos-anilin ausgewaschen.

Das Verhalten der Rosaniline und Pararosaniline kann man am besten in einer Reihe, die aus den pro-gressiv stärker wirkenden Entfärbungsarten aufgebaut ist, darstellen. Es wirken nach vorher Gesagtem zu-nehmend stärker entfärbend:

1. Alkohol.
2. Acetonalkohol.
3. Säuren[1])- Alkohol.
4. Säuren-Acetonalkohol.
5. 3 % HCl-Alkohol.
6. Säuren - 24 h Aceton-Alkohol.

---

1) Unter Säuren wird die 1 Min. lang dauernde Einwirkung von 5 % Salpetersäure und anschliessend daran die 10 Sek. dauernde Behandlung mit 3 % Salzsäure verstanden.

Bei Anwendung von 1) und 2) behalten also die jodierten und unjodierten Rosaniline gleichstarken Farbton; bei Anwendung von 5) und 6) sind sie gleich stark entfärbt; nur 3) und 4) wirken derart, dass das unjodierte Präparat schon stark an Farbe verliert, während das jodierte noch tief dunkelrot bleibt. Die Pararosaniline verhalten sich dagegen so, dass bei Anwendung von 1)—5) die jodierten den typisch dunklen Ton der Gramfärbung aufweisen, die unjodierten aber hellviolett erscheinen. Erst bei 6) zeigen die mit Jod behandelten Präparate denselben hellen Ton wie die unjodierten.

Nach diesen den früheren Anschauungen ganz entgegengesetzten Ergebnissen der Beeinflussung von Triamidotriphenylmethanfarben durch die Jodierung lag es nahe, andere verwandte Farbstoffverbindungen in dieser Richtung zu untersuchen. Stellt man mit Malachitgrünfarben, Diamidotriphenylmethanfarben, analoge Versuche wie mit Rosanilinen an, so kann man nachweisen, dass schon bei Anwendung von Alkohol eine deutliche Differenz zwischen jodierten und nicht jodierten Präparaten eintritt. Erstere sind intensiv dunkelgrün, letztere aber von weniger kräftigem bläulichgrünen Farbton. Selbst nach HCl-Alkohol ist das jodierte noch nicht farblos wie das unjodierte, sondern zeigt den Anthrax als hellgrünes Stäbchen mit dunkelgrünen, meist seitlich balken- oder kappenförmig anliegenden Granulis. Erst bei Verwendung von Säuren und 24 h Acetonalalkohol werden die mit Jod behandelten und die nicht behandelten gleichmässig farblos. — Auffallenderweise

ergibt sich also, dass die jodierten und nicht jodierten Malachitgrünfarben sich genau wie die analog behandelten Pararosaniline verhalten.

Es war demnach auch bei einem anderen Phenylmethanfarbstoff, dem Auramin, (Diamidodiphenylmethan) nicht ausgeschlossen, dass seine färberischen Eigenschaften durch Jodjodkali beeinflusst würden. Auch mit ihm war es möglich, am Anthrax dieselben gesetzmässigen Beziehungen zwischen jodierten und unjodierten Präparaten festzustellen wie bei den übrigen Phenylmethanen. Denn bei Anwendung von Alkohol als Entfärbungsmittel war der unjodierte Ausstrich schwach hellgelb, während der jodierte Anthrax einen kräftigen goldgelben Ton und vielfach braune stäbchenförmige Granula zeigte. Erst der Salzsäure-Alkohol entfärbte beide gleichmässig.

Zur weiteren Prüfung dieser Befunde wurden Staphylokokken auf ihre Bindungskraft jodierten und unjodierten Rosanilinen, Malachitgrünfarben und dem Auramin gegenüber bei Anwendung derselben Versuchsanordnung wie beim Anthrax untersucht. Das Resultat war der Nachweis, dass sie sich dabei genau so verhielten, wie der Milzbrandbacillus. Bei Rosanilinen tritt nämlich nur ein deutlicher Unterschied zwischen jodierten und unjodierten Präparaten bei Anwendung von 3) u. 4) nach obiger Scala ein, während die mit Malachitgrünfarben imprägnierten schon bei Anwendung von 1) eine sichtbare Differenz zeigen und bei 5) der jodierte Ausstrich noch kräftig grasgrün ist, während der un-

jodierte alle Farbe abgegeben hat. Das jodierte und unjodierte Auramin-Präparat zeigt einen deutlichen Farbunterschied schon bei 1), und noch bei 4) ist ein Farbstoffrest in dem mit Jod gebeizten Ausstrich nachweisbar, während der nicht mit Jod behandelte vollkommen farblos ist. Daraus geht eindeutig hervor, dass es nicht die grössere Masse der Zellensubstanz des Anthrax sein kann, die diese Verbindungen so stark festhält, sondern dass es sich um eine echte Affinität handelt.

Es muss daher betont werden, dass der Unterschied im mikrochemischen Verhalten der Rosaniline und Pararosaniline in Bezug auf ihre Verwendbarkeit zur Gramfärbung höchst wahrscheinlich nur ein quantitativer aber nicht ein qualitativer, wie Unna angenommen hat, ist. Dasselbe gilt vom Vergleich der Pararosaniline mit den Malachitgrünfarben und dem Auramin.

Immerhin war es nicht ausgeschlossen, dass Gramnegative sich gegenüber den Phenylmethanfarben, die auf ihre Brauchbarkeit zur Gramreaktion noch nicht untersucht waren, ebenso verhielten, wie die Grampositiven. Versuche mit Paratyphus, Koli und einem gramnegativen Kapselbazillus, der aus dem Urin isoliert war, zeigten aber, dass die Phenylmethane weder von jodierten noch von unjodierten Bakterien festgehalten wurden!

Nach alle dem ist als sicher zu erachten, dass zur Gramfärbung nicht nur die Pararosaniline, sondern auch die Rosaniline, Melachitgrünfarben und das Auramin, brauchbar sind, wie die Beispiele am

Anthrax, Tuberkelbazillus und Staphylokokken zeigen und zeigen werden. Am besten für den praktischen Gebrauch eignen sich allerdings die Pararosaniline oder auch die Malachitgrünfarben. Der Grund dafür ist das ihnen zukommende feste Haften und die leicht hervortretende Beeinflussung durch Jod, wie dies oben gezeigt wurde.

Alle vier Farbstoffe, das Diamidodiphenylmethan, die beiden Triamidotriphenylmethane und das Diamidotriphenylmethan, die zur Gruppe der Phenylmethanfarben gehören, zeichnen sich vor den anderen zu dieser Klasse zählenden durch die Amidogruppe aus, so dass man sie wohl als „Amidophenylmethanfarben" zusammenfassen kann. Bei den ihnen sehr nahe stehenden Rosolsäurefarben ist dagegen die Amidogruppe durch das Hydroxyl, bei den Phtaleinen teils durch das Hydroxyl teils durch die Carboxylgruppe ersetzt und bei den Pyroninen treten anstelle des Wasserstoffs der Amidogruppe andere Atomkomplexe. Ob nun eine dieser letztgenannten Gruppen auch zur Darstellung nach Gram verwendbar sein sollte, kann ich nicht entscheiden, da die Untersuchungen auf die Amidophenylmethane beschränkt blieben.

Wenn Unna ferner in jener Arbeit behauptet, er könne durch diese mikrochemische Reaktion sogleich ein Rosanilin von einem Pararosanilin unterscheiden, so muss dies nach Obengesagtem bis zu einem gewissen Grade zugegeben werden. Wenn er dazu aber den Tuberkelbazillus verwenden will und von ihm dieselben färberischen Unterschiede wie vom Lepraerreger er-

wartet, d. h. dass er sich bei Rosanilinen als Stäbchen, bei Pararosanilinen aber als Kokkenreihe zeige, so sprechen mit Sputum-Ausstrichen angestellte Versuche dagegen. Denn hier erscheint der Tuberkuloseerreger mit unjodierten Pararosanilinen dargestellt stets als mehr oder weniger homogen tingiertes Bakterium, während beide Farbstoffe jodiert ihn als Granulareihe oder als ein schwächer gefärbtes Stäbchen mit prägnanter Körnelung zeigen.

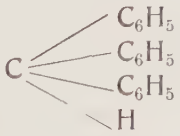
Zur Herstellung dieser Bilder bedient man sich am besten des Verfahrens nach Much, wobei man nur statt des Methylvioletts den zu untersuchenden Farbstoff einzusetzen hat. Die Wirkung des Jods kann man auch an einem nach Ziehl gefärbten Präparat — wobei aber auch das Fuchsin 16 h im Brutschrank einwirken muss — gut zeigen, wenn man vor der Entfärbung mit HCl-Alkohol 5 Min. mit Jodjodkali beizt. Der Tuberkelbazillus stellt sich dann als rotes stabförmiges, mit deutlichen schwarzroten Körnerreihen versehenes Gebilde dar.

Ausgeprägter war diese Erscheinung noch bei der Verwendung von Malachitgrünfarben und Auramin. Bei Anwendung unjodierter Malachitgrünfarben zeigte sich der Tuberkelbazillus, wenn man nach den Grundsätzen des Muchschen Verfahrens verfuhr, als ziemlich gleichmässig gefärbtes Stäbchen, während ihn jodierte als eine Körnerreihe darstellten. — Auch das Auramin fügt sich diesem gesetzmässigen Verhalten. Beizt man, nachdem es 24 Stunden bei 37° eingewirkt hat, 5 Min. mit

Jodjodkali, um dann mit Acetonalkohol zu entfärben, so bekommt man die Tuberkuloseerreger als gelbe Stäbchen mit brauner Granulareihe zu Gesicht. Das ohne Jodierung entfärbte Präparat aber zeigt nur schwachgelbe Bazillen ohne Körnelung.

Wenn demnach diese Befunde stark von der Anschauung Unnas abweichen, so ist dies vielleicht darauf zurückzuführen, dass er auch bei der Untersuchung des Tuberkelbazillus mit Gewebsschnitten arbeitete, während von mir Sputumausstriche verwandt wurden. Sicher geht das aus seinen Angaben allerdings nicht hervor, die in diesem Punkt wenig ausführlich sind.

Von den einzelnen Salzen des Pararosanilins ist Unna der Meinung, dass sie gleich gut zur Gramfärbung verwendbar sind, und er bezeichnet als das Wesentliche für ihre Tauglichkeit ihren Pararosanilincharakter, d. h. die Gruppe:



Diese Meinung fand ich bei Versuchen mit Gentiana-Violett, Methyl-Violett, Aethyl-Violett, Kristall-Violett und Viktoriablau bestätigt. Ob es sich um ein methyliertes, äthyliertes oder phenyliertes Pararosanilin handelte, war jedenfalls bei diesen Versuchen nach Gram gleichgültig. Doch genügt nach Vorhergesagtem wahr-

scheinlich schon der allgemeinere chemische Charakter als „Amidophenylmethan".

Nachdem nun Bittrolf und Momose gezeigt hatten, dass auch die modifizierten Grammethoden, die ursprünglich der Tuberkelbazillendarstellung dienen sollten, auf andere Grampositive anwendbar sind, lag es nahe, das Verhalten der einzelnen Pararosanilinsalze bei den Verfahren nach Much und Weiss zu prüfen. Die Ergebnisse dieser Versuche, die hauptsächlich mit Anthrax, Diphtheriebazillen, Staphylokokken und Tuberkelbazillen angestellt wurden, können hinsichtlich der Methode nach Much dahin zusammengefasst werden, dass die Pararosaniline untereinander verglichen bei derselben Bakterienart und derselbe Farbstoff bei verschiedenen Bakterienarten angewandt ganz wechselnde Resultate ergaben. Das Gentiana-Violett zeichnete sich durch seine schlechte Darstellung von Granulis bei Anthrax und Diphtherie aus, während Aethyl-Violett, Kristall-Violett und Viktoriablau bei diesen beiden Bakterienarten einzelne Individuen granuliert, andere aber homogen gefärbt darstellten. Beim Tuberkelbazillus liefern aber gerade die drei letzten ausserordentlich klare und prägnante Bilder der Körnerreihen. Am regelmässigsten bei allen Bakterienarten und allen Individuen des einzelnen Ausstriches bekommt man bei Anwendung des Methyl-Violetts Granula zu Gesicht. Danach scheint doch die Art des Pararosanilinsalzes nicht ganz einflusslos auf die Bindung des Farbstoffes an die Zellsubstanz zu sein. Eine differenzierte Färbung der Staphylokokken jedoch ist durch keinen Farbstoff möglich.

Es stehen diese besonderen Beziehungen nicht im Widerspruch mit dem oben aufgestellten Grundsatz von der chemischen Eigenart der zur Gramreaktion brauchbaren Farbstoffe. Dort handelt es sich um den Nachweis der Beeinflussung ihrer färberischen Fähigkeiten durch Jod im Gegensatz zu nichtjodierten Verbindungen, womit noch nicht ihr vollkommen gleichmässiges Verhalten untereinander auch bei Modifikationen der Grammethode erwartet werden muss.

Noch deutlicher tritt dieser Gesichtspunkt bei Anwendung der Methode nach Weiss auf den Anthrax hervor. Hier zeigt sich eine grosse Verschiedenheit in der Brauchbarkeit der einzelnen Glieder der Gruppe. Man bekommt eine scharfe Trennung des Rosanilins und des Pararosanilins in der Bakterienzelle nur bei der von Weiss angegebenen Mischung Fuchsin: Methyl-Violett = 3 : 1. Alle anderen Pararosaniline sind unbrauchbar, sei es nun, dass man sie im Verhältnis von 3 : 1 oder 1 : 3 oder 1 : 1 zum Fuchsin anwendet. Immer bekommt man Mischfarbtöne. Hier ist es wohl mit Sicherheit die Methylgruppe des Methylvioletts, der diese einflussreiche Rolle zukommt. Kompliziert wird diese Frage allerdings dadurch, dass das Methylviolett ein Gemisch aus Hexa-Penta- und Tetra-Pararosanilin ist. Daraus aber, dass das Kristall-Violett, ein reines Hexa-Methylviolett, zur Weissfärbung nicht brauchbar ist, ist man berechtigt zu schliessen, dass die Hexaverbindung nicht die ausschlaggebende Komponente ist. Da jedoch die beiden anderen Salze, die Penta- und Tetraverbindung,

nicht rein im Handel zu haben sind, kann man die Frage nach der Bedeutung der drei einzelnen Pararosaniline nicht restlos beantworten. Auszuschliessen ist dabei jedoch nicht, dass eben nur dem Gemisch die Verwendbarkeit zur Weissfärbung zukommt und keines der Glieder, einzeln angewandt, brauchbar ist.

Von besonderem Interesse ist noch das Verhalten des Fuchsins bei dieser Methode. Lässt man nämlich ein Weisspräparat des Anthrax 24 Stunden in Acetonalkohol liegen, so zeigt es einen dunkelroten Farbton mit violettem Schimmer, während Granula nicht mehr zu erkennen sind. Demnach ist das Fuchsin fast vollkommen haften geblieben, während das Pararosanilin zum grössten Teil durch den Alkohol ausgewaschen wurde. Färbt man dagegen allein mit Fuchsin und behandelt das Präparat jodiert oder unjodiert nach Säureeinwirkung 24 Stunden mit Acetonalkohol, so ist der Farbstoff fast nicht mehr in der Bakterienzelle nachweisbar. Bei alleiniger Anwendung von Methylviolett aber entspricht der Gehalt der jodierten oder unjodierten Bakterienzelle an Pararosanilin etwa dem Bilde des Weiss-Präparates.

Wodurch kann dies eigentümliche Verhalten des Fuchsins bei der Mischung beider Farbstoffe bedingt sein? Da gibt es mehrere Möglichkeiten. Einmal konnte die Ursache im Pararosanilin liegen, indem seine Anwesenheit im Gemisch eine festere Bindung des jodierten Fuchsins durch die Zellsubstanz bedingt, oder es ist der Komplex Jod-Pararosanilin, der ein

besonders festes Haften des Fuchsins, sei es jodiert oder unjodiert, ermöglicht; oder schliesslich es entsteht eine Verbindung Rosanilin-Jod-Pararosanilin, bei der der intensivere Farbton des Fuchsins überwiegt.

Es liegt mir hier nur daran, die wirksame Komponente für dies auffallend feste Haften des Fuchsins zu finden, ohne dass ich damit die Art der chemischen Bindung klargelegt haben will. Es soll nur gezeigt werden, ob es das Pararosanilin oder das Jod-Pararosanilin ist, das dies Verhalten des Fuchsins bewirkt.

Um alle obengenannten Möglichkeiten zu erproben, war es nötig, folgende Versuche anzustellen:

1. (Fuchsin:Pararosanilin = 3 : 1) Färbg. jodiert — Säuren - Acetonalkohol 24 h.
2. Fuchs. Färbg. jodiert - mit Wasser abspülen - Pararosanil. Färbg. - Säuren - Aceton - Alkohol 24 h.
3. Pararosanil. Färbg. jodiert - Acet. Alk. abspülen — Fuchs. Färbg. - Säuren - Acet-Alkohol 24 h.
4. Pararosanil. Färbg. jod. - Acet.-Alk. abspülen — Fuchs. Färbg. jod. - Säuren - Aceton-Alkohol 24 h.

Ebensolche Präparate wurden auch mit nur einige Minuten dauernder Entfärbung durch Acetonalkohol hergestellt.

Bei Präparat 1) erhält der Anthraxbacillus ein intensiv dunkelrotes Aussehen mit violetter Nuance. Das zweite Verfahren zeigt ihn als violettes Stäbchen mit rötlichem Schimmer. Bei 3) ist der Milzbrandbacillus schwach rotviolett und bei Methode 4) bekommt man kräftig rote Bakterien zu Gesicht.

Keine dieser Combinationen ergibt demnach dieselben Resultate wie die Weissfärbung. Nur im Falle 1) erhält man nach kurzer Entfärbung das typische Bild des nach Weiss gefärbten Anthrax. Bei allen übrigen fehlt nach 24stündigem Extrahieren das Dunkelrot mit violettem Schimmer, das dem auf diese Weise behandelten Originalpräparat nach Weiss (1) zukommt. Zieht man zu diesen Ergebnissen noch den Umstand in Rechnung, dass Präparat 4) fast nur die Farbe des Rosanilins zeigt und somit 1) am ähnlichsten sieht, so spricht das auch dafür, dass die Jodwirkung auf beide Farbstoffe nötig ist, um ein derartig festes Haften des Fuchsins zu ermöglichen.

Zur Erklärung des Resultates von Präparat 1) bleibt demnach nichts weiter übrig, als die Bildung eines Komplexes Rosanilin-Jod-Pararosanilin anzunehmen, der sich als fest gegen Säuren und Alkoholentfärbung erweist und bei dem färberisch die Rosanilinkomponente überwiegt.

Der Hauptgrund für den Unterschied aller hier gewonnenen Erfahrungen und der von Unna vertretenen Meinung ist wohl einmal darin zu suchen, dass Unna nur mit Gewebsschnitten arbeitete, die ihm die Darstellung der Bakterien erschwerten, und wobei er den Fehler machte, färberische Vergleiche zwischen dem Gewebe und den Spaltpilzen anzustellen, und dann darin, dass er nur jodierte Rosaniline und Pararosaniline untersuchte, niemals aber die Eigentümlichkeiten un-

jodierter Präparate studierte. Der Einfluss des Jods auf die Rosaniline musste ihm dabei verborgen bleiben.

Waren die Meinungen über die Verwendbarkeit der Farbstoffe für die Gramfärbung bis jetzt nicht geteilt, sondern wurde Unnas Ansicht als unbestritten richtig anerkannt, so kann man dasselbe nicht von der Anschauung über das Wesen der Gramfärbung behaupten. Hier handelt es sich um zwei Richtungen; die einen führen die Gramfestigkeit auf physikalische, die anderen auf chemische Ursachen zurück.

Ein Vertreter der ersteren Richtung ist besonders Eisenberg. Nach ihm beruht die Gramfestigkeit auf der grösseren Dichtigkeit des Ektoplasmas, das die grossen Jodfarbstoffmoleküle zurückhalten soll. Er führt den Nachweis des Ektoplasmas an Präparaten nach Claudius und an solchen, die mit einer von ihm angegebenen Modifikation des Claudius'schen Verfahrens gefärbt sind. Dabei ist das Ektoplasma fast nie vollkommen darzustellen, wie er selber zugibt. Auch mit einer zweiten von ihm angewandten Methode, bei der er eine Doppelfärbung benutzt, gelingt es ihm nicht, ein unversehrtes Ektoplasma nachzuweisen. Er bezeichnet vielmehr die dunkelgefärbte äussere Schicht als „lädierte Rindenschicht."

Es ist demnach wohl als ein Widerspruch anzusehen, dass die Bakterien, trotz der Unvollkommenheit der Rindenschicht sich grampositiv verhalten, während doch der Farbstoff gerade durch die grössere Dichtigkeit des Ektoplasmas zurückgehalten werden

soll und das Endoplasma allein ihn angeblich nicht gegen Alkohol festhalten kann. Im Gegensatz zu dieser Meinung zeigt aber ein Anthrax-Präparat, das nach Claudius gefärbt ist und danach zuerst mit 1% und dann mit 3% HCl-Alkohol entfärbt wird, keine Ektoplasmafärbung mehr, sondern die ganze Bakterienzelle erscheint gleichmässig intensiv dunkelviolett. Die Aussenschicht hat den Farbstoff somit zum mindesten stärker abgegeben als die Innenschicht. Diese weist denselben Farbton auf wie bei der Entfärbung mit Alkohol allein, trotzdem die Extraktion mit HCl-Alkohol so lange fortgesetzt wurde, bis kein Farbstoff mehr abging. Daraus folgt, dass das Endoplasma den Farbstoff offenbar sogar fester hält als das Ektoplasma, und dass jenes somit auch sicher ohne den Schutz der Rindenschicht imstande ist, den Farbstoff bei Entfärbung mit Alkohol zu fixieren, wenn es ihn selbst bei Anwendung von HCl-Alkohol nicht abgibt. Demnach ist es zur Erklärung der Gramfestigkeit durchaus überflüssig, eine besondere Undurchlässigkeit des Ektoplasmas anzunehmen, denn die Innenschicht bindet den Farbstoff selbst fest genug.

Dagegen spricht im Sinne einer chemischen Bindung die ausschliessliche Färbung des Endoplasmas mit Fuchsin bei der von Eisenberg vorgenommenen Modifikation der Färbung nach Claudius. Er lässt nämlich auf die Färbung nach Claudius eine kurze Nachfärbung mit Karbolfuchsin 1 : 10 folgen. Nach meinen Erfahrungen ist es aber gleichgültig, in welcher Reihenfolge man Rosanilin und Pararosanilin einwirken

lässt; stets haftet der rote Farbstoff in der Innenschicht. Denn man erhält dieselben Bilder des Anthrax, ob man ihn nach Claudius-Eisenberg färbt, oder ob man zuerst mit Fuchsin tingiert und dann nach Claudius färbt.

Auch Kruse äussert sich in seiner „Mikrobiologie“ (Kap. 1 § 18 p. 43) „Dafür, dass die physikalische oder chemische Beschaffenheit der Aussenschicht an dem Zustandekommen der Gramschen Reaktion wesentlich beteiligt sei, hat man nicht den geringsten Anhaltspunkt.“ Und Grimme konnte durch seine Versuche am Bazillus tumescens zeigen, dass die Bakterienmembran, ein Teil des Eisenberg'schen Ektoplasmas, nicht für die Gramfestigkeit verantwortlich zu machen ist. (Central-Blatt für Bakt. Bd. 32 1902, p. 164).

Eisenberg wendet auch — wie oben schon erwähnt wurde — eine Doppelfärbung zur Darstellung seines Ektoplasmas an. Er behandelt die Präparate zuerst mit Aurantia und lässt eine Nachfärbung mit Methylviolett folgen. Das typische daraus resultierende Bild ist dann nach seiner Angabe eine Bakterienzelle mit gelbem Innenteil, der von einem violetten Saum umgeben ist. Er erklärt dies Aussehen derart, dass sich das zuerst angewandte Aurantia in der Innenschicht verankere infolge besonderer physikalischer oder chemischer Verhältnisse, während es von der Rindenschicht nicht fesgehalten werde, die sich dann aber bei der Nachfärbung mit Methylviolett imbibiere. Eisenberg muss hier selbst dem Gedanken einer chemischen Affinität nahe treten. Einen physikalischen Grund für

dies getrennte Haften weiss er auch garnicht anzugeben. Wie aber wollte er vollends physikalisch das elektive Verhalten bei der gleichzeitigen Anwendung zweier Farbstoffe erklären, wie es bei der Färbung nach Weiss beim Anthrax und dem Diphtherieerreger in deutlichster Weise hervortritt!

Es ist jedenfalls zum besseren Verständnis der Bedeutung, die Eisenberg dem Ektoplasma für die Gramfestigkeit zuschreibt, von Nutzen, seine Anschauungen über den feineren Bau der grampositiven Bakterienzelle kurz zusammenzufassen. Er stellt sich im Einzelnen die physikalischen Verhältnisse der Aussen- und Innenschicht derart vor, dass das Endoplasma enge Poren aber eine lose Struktur, das Ektoplasma dagegen weite Intermicellarräume und eine kompaktere Struktur besitzen soll. In diese weiteren Poren passen nun die grossen Moleküle, die sich bei der Beizung der Farbstoffe bilden, besser hinein als in die engen der Innenschicht. Dadurch werden sie fester gehalten und die Färbung wird „physikalisch echter". Dies ist der Grund für die Undurchlässigkeit der Aussenschicht.

Diese komplizierten Vorstellungen, die Eisenberg vertritt, gehen doch wohl etwas über das Gebiet der experimentell nachweisbaren Erfahrungstatsachen hinaus. Sie können schwerlich noch im Sinne einer Erklärung einer rein empirischen Wissenschaft aufgefasst werden. Erklärung besteht nach Windelband (Geschichte der Philosophie, 6. Aufl. S. 40) „in dem Zurückführen des Auffallenden, nicht Selbstverständlichen auf solche ein-

fachere Arten des Geschehens, welche als die der Anschauung gewohntesten einer Erklärung selbst nicht zu bedürfen scheinen.“ Was darüber hinausgeht, gehört ins Reich der Hypothesen, die wohl Anspruch darauf erheben können, einen Vorgang in irgend einer bildlichen Form dem Verständnis näher zu bringen, die aber nicht das tatsächliche Wesen des Vorgangs zum Ausdruck bringen wollen. Es wird wohl keinem einfallen, die Ehrlich'sche Seitenkettentheorie, trotzdem sie die Verhältnisse bei der Immunität gewiss in klassischer Weise verständlich zu machen imstande ist, als eine Erklärung anzusehen, die den tatsächlichen Vorgängen bei der Giftbindung entspricht. Es ist eine Anschauungsform für an sich unbekannte und verborgene Wechselwirkungen aber keine Erklärung. Ebensowenig kann man jene färberischen Erscheinungen in ihren letzten Beziehungen auf solche Art physikalisch erklären, da wir nur hypothetische Vorstellungen über die molekulare Struktur des Protoplasmas besitzen. — Sollten aber Eisenbergs Ansichten über den Aufbau des Ekto- und Endoplasmas, die doch die Begründung der physikalischen Wirkungsweise der Aussenschicht sind, auch nur hypothetisch gemeint sein, so sinkt damit die ganze Ektoplasma-Anschauung auf die Wahrscheinlichkeit einer Hypothese, ohne noch den Wert eines Beweises zu besitzen, da der Einfluss des Ektoplasmas auf die Gramfärbung ohne nähere Bestimmung seiner physikalischen Eigenschaften höchst zweifelhaft ist.

So ist es auch nicht meine Absicht, das Wesen der chemischen Bindung erklären zu wollen, sondern es liegt mir nur daran, die Eigentümlichkeiten jener Bakterienfärbung auf das in der Chemie wohl bekannte Prinzip der Affinität zurückzuführen, das eine Erfahrungstatsache ist, aber keine Hypothese.

Ein weiterer Vertreter der physikalischen Richtung ist Kruse. Er schliesst aus dem Umstand, dass gramfeste Bakterien gegen 1% Kalilauge und Trypsin widerstandsfähiger sind als gramnegative, dass die Gramfestigkeit auf einer grösseren physikalischen Dichtigkeit des Zellkörpers der Grampositiven gegenüber den nach Gram nicht Färbbaren beruhe. Zu im Prinzip gleichen Anschauungen kommt Brudney. Er konnte nachweisen, dass sich die plasmolysierbaren Bakterien gramnegativ, die nicht plasmolysierbaren aber grampositiv verhalten. Danach sucht er den Grund für die Gramfestigkeit in einer verschiedenen Permeabilität der Grampositiven und Gramnegativen für eine Jod-Gentianaviolettverbindung. Und Fischer steht auf dem Standpunkt, dass die Gramfestigkeit auf dem grösseren Substanzreichtum und der daraus resultierenden grösseren Adsorptionskraft der Grampositiven beruhe.

Gegen die Richtigkeit aller dieser physikalischen Erklärungsmethoden ist der Einwand zu machen, dass sie gewissen färberischen Phänomenen, die im folgenden genauer erörtert werden sollen, nur schwerlich gerecht werden können, dass dies Verhalten dagegen ungezwungen chemisch zu verstehen ist.

So vertritt auch Unna schon den chemischen Standpunkt. Er ist der Meinung, dass die Ursachen der Gramfestigkeit in einer festen Jod-Pararosanilin-Zellprotoplasmaverbindung zu suchen ist. Und Grimme spricht sogar von einer besonderen Substanz, die der Träger der Gramfestigkeit sein soll. Er sagt von ihr: „Dass sie durch heisse HCl, 1%ige Kalilauge, 5%iges Natriumkarbonat, Pepsin und Trypsin nicht verändert wird und relativ schwer in Alkohol löslich sei.“ Seine Versuche sind wohl aber deshalb nicht eindeutig, weil er die betreffenden Chemikalien auf fixierte Präparate einwirken lässt, so dass er es mit koagulierten Eiweisskörpern und nicht mit der unveränderten Bakterienzelle zu tun hat.

Zu ähnlichen Anschauungen, wie sie Unna und Grimme haben, führten nun auch meine Färbungsversuche mit modifizierten Grammethoden, d. h. mit den Verfahren nach Much und Weiss, die mit Anthrax, Diphtherieerregern, Tuberkelbazillen und Staphylokokken vorgenommen wurden. Es zeigte sich nämlich — kurz zusammengefast — dass einzelne Bezirke der Bakterienzelle den Farbstoff intensiver hielten als ihre Umgebung, dass bei Anwendung eines Gemisches kleine Teile eine besondere Affinität zu dem einen Farbstoff bewiesen, dass in anderen Fällen der Farbstoff überhaupt nur in Granulaform abgelagert wurde, während die übrigen Teile der Zelle entfärbt waren, und dass noch andere metachromatische Eigenschaften besassen

Es ist bei der Wichtigkeit dieser auffallenden Erscheinungen für die Auffassung des Wesens der Grammethode unerlässlich, etwas näher auf die Bedingung ihrer Darstellung und ihre Verwertung einzugehen. — Dass nach der Methode von Much eine Darstellung von Granulis beim Anthrax möglich ist, wurde schon oben hervorgehoben. Rein färberisch stellen sie sich als verschieden starke Farbimprägnation an einzelnen Stellen der Bakterienzellen dar. Morphologisch betrachtet erscheinen sie beim Anthrax teils als Körnchen teils als Kappen teils als seitlich balkenförmig anliegende Gebilde, die bei der Tingierung mit dem Pararosanilin eine bedeutend dunklere Farbe angenommen haben, als die übrigen Partieen des Spaltpilzes. Ob hier nur eine grössere Farbstoffmenge abgelagert ist, oder ob es sich dabei um die Folgen einer qualitativ anders verlaufenen chemischen Bindung handelt, kann man an den mit Malachitgrünfarben imprägnierten Präparaten entscheiden. Bei ihrer Entfärbung mit Alkohol, Acetonalkohol oder Säuren und Alkohol sind sie, wie oben gezeigt wurde, ganz gleichmässig gefärbt; bei der nächsten Stufe aber — Säuren-Acetonalkohol —, gibt schon der grössere Teil der Bakterienzelle den Farbstoff ganz oder teilweise ab, während er nur noch in kleinen circumscripten Partien in reichlicher Menge haften bleibt. So entsteht das Bild der Granula. Der Unterschied zwischen stärker und schwächer gefärbten Teilen ist somit höchst wahrscheinlich nur ein quantitativer aber kein qualitativer. Aehnliche Bilder, die

eine ungleiche Verteilung des Farbstoffes zeigen, erhält man beim Auramin. Hier erscheinen die Granula als braune Bälkchen oder Kappen auf goldgelbem Hintergrund.

Sollten diese Phaenomene physikalisch erklärt werden, so müsste man an den Stellen, wo der Farbstoff einen anderen Farbeffekt hervorgebracht hat, von der Umgebung differente physikalische Verhältnisse annehmen, d. h. solch eine Bakterienzelle müsste hier weite, dort enge Poren oder Intermicellarräume, hier grössere, dort geringere Dichtigkeit besitzen, oder die Adsorptionskraft müsste an der einen Stelle grösser als an der anderen sein. Fasst man dagegen den Bindungsprozess als eine chemische Reaktion auf, so ist unschwer zu verstehen, wie bei besonders starker Affinität des Farbstoffs zu einem Zellbestandteil, der nicht gleichmässig im Bakterienleib verteilt ist, solche Bilder entstehen können. Sind doch chemisch differente Einschlüsse in Spaltpilzen wohl bekannt, wie beispielsweise die Polkörperchen des Diphterieerregers, deren Färbung durch essigsaures Methylenblau bei Anwendung der Neisserschen Methode ein elektives Verhalten auf chemischer Basis demonstriert.

Wieder andere Bilder als beim Anthrax erhält man bei Anwendung des Muchschen Verfahrens auf Diphtheriebazillen, wobei man auch die verschiedenen Pararosaniline benutzen kann. Hier heben sich dunkle Granulareihen von dem stäbchenförmigen Hintergrund ab. Auch hier ist das Bild verschieden starker Farb-

bindung aufs deutlichste ausgeprägt. Besonders bedeutungsvoll für die chemische Auffassung ist aber der Umstand, dass die Granula stets als central liegende Körnchenreihen auftreten, während die Peripherie einen weniger intensiven Farbton zeigt. Die Farbaufspeicherung in der Mitte kann also unmöglich die Folge einer Zurückhaltung des Pararosanilins durch die etwa undurchlässigere Aussenschicht sein. Man muss vielmehr annehmen, dass die Jod-Pararosanilinverbindung in central gelegenen Bakterienbestandteilen in chemischer Weise verankert wird. Ja bei Anwendung von Malachitgrünfarben mit nachfolgender Jodierung und Säureanwendung wie bei Much ist sogar der grösste Teil der Zelle vollkommen farblos, und man sieht nur intensiv grüne zentrale Granulareihen. Hier zeigen die Körnchen eine noch bedeutend überlegenere Bindungskraft gegenüber den Diamidotriphenylmethanen als die äusseren Partien.

Eine äusserst feine Auswahl unter zwei gleichzeitig einwirkenden Farbstoffen findet bei Anthrax und Diphtheriebazillen bei Färbung mit dem Verfahren nach Weiss statt. Bei beiden wird das Pararosanilin von den bei dieser Methode auftretenden Körnchen gehalten, die dieselbe Form haben wie die oben bei dem Much-schen Verfahren beschriebenen. Der übrige Teil der Zelle färbt sich rot mit Fuchsin. Die sich scharf abgrenzenden verschieden gefärbten Distrikte der Zelle beweisen ein ausgesprochen elektives Verhalten verschiedener Zellbestandteile zu chemisch sich nahe-

stehenden Verbindungen. Man kann sich diesen Vorgang nur als eine feine chemische Reaktion vorstellen. Denn eine physikalische Auslese ist wohl nicht möglich, selbst wenn man verschieden grosse Intermicellarräume und Moleküle des Rosanilins und des Pararosanilins annimmt.

Hält man die Pararosanilinmoleküle und die Intermicellarräume der Granula für die grösseren, so dass die kleineren Rosanilin-Atomkomplexe daraus ausgeschwemmt werden, so ist nicht einzusehen, wie das Pararosanilin zu den offenbar zentral liegenden Granulis des Diphtherieerregers gelangen soll. Stellt man sich aber die Rosanilinmoleküle grösser vor und ebenso die Intermicellarräume des übrigen Zellkörpers, so ist die Färbung der zentralen Granula des Diphtheriebazillus möglich, und das Bild des Anthrax, bei dem wenigstens ein grosser Teil der Körnchen peripher zu liegen scheint, wäre auch verständlich. Warum aber bleiben bei der Färbung nach Much die kleineren Pararosanilinmoleküle plötzlich in den für sie zu grossen Intermicellarräumen haften und werden selbst durch Säuren und Acetonalkohol nicht ausgeschwemmt? Vollends zeigt die Wirkung des HCl-Alkohols, der die Granula völlig zum Verschwinden bringt, dass die Pararosaniline in den Körnchen im Vergleich zur übrigen Zellsubstanz nicht fester haften. Man sieht, dass man sich mit der physikalischen Anschauung unbedingt in Widersprüche verwickeln muss.

Sehr bezeichnend für die Feinheit jener Reaktion ist auch das Verhalten des Diphtheriebazillus einem

Gemisch von Methylviolett und Rosanilin gegenüber, von dem sich das Fuchsin bekanntlich nur dadurch unterscheidet, dass es das salzsaure Salz des Rosanilins ist. Hier tritt nämlich bei Anwendung von drei Teilen Rosanilin und einem Teil Methylviolett keine Trennung der Farbstoffe ein! Denn Granula sind nicht zu sehen, die Zelle zeigt vielmehr einen durchaus rotvioletten Farbton.

Rein chemisch betrachtet würden nach alledem die Verhältnisse so liegen, dass gewisse ungleichmässig verteilte Bestandteile der Bakterienzelle eine Jodpararosanilinverbindung — wie seit Unna feststeht — einzugehen imstande sind! Lässt man aber ein Gemisch aus Rosanilinen und Pararosanilinen einwirken, so tritt eine besondere Affinität einer anderen Zellsubstanz, die im Körper des Anthrax diffus verteilt ist, für das Rosanilin zutage, oder sie bildet, wie es frühere Versuche wahrscheinlich machten, mit dem Farbstoff eine Rosanilin - Jod - Pararosanilinverbindung. Diese Anschauungsweise kann all den verschiedenen färberischen Erfolgen, wie sie sich besonders bei Anwendung der Farbgemische zeigen, gerecht werden.

Wenn es noch unter den hier gegebenen Bedingungen eine Erscheinung gibt, die nur chemisch zu verstehen ist, so ist das die Metachromasie, zu deren Zustandekommen nach Ehrlich ein metachromatischer Farbstoff und eine chromotrope Zellsubstanz gehört. Metachromatische Farbstoffe sind unter anderem die basischen Triphenylmethanfarben, die mehrere me-

thylierte Amidogruppen enthalten. Im folgenden Falle ist es jedoch eine ganz nahe verwandte Verbindung, ein dreifach phenyliertes Rosanilin, das diesen Farbeffekt zeigt. Färbt man nämlich einen Diphtherieausstrich mit Spritblau — Triphenyl-Rosanilin — jodiert und entfärbt dann mit Alkohol, so erscheint ein Teil der Bakterien blau, ein anderer dunkelrot, einige teils blau teils rot, und der Rest ist farblos. Wir haben es demnach mit einer metachromatisch verlaufenen Gramreaktion zu tun. Metachromasie aber tritt nach Ehrlich bei der Lösung von metachromatischen Farbstoffen auf. Der Farbton des Farbstoffs ist dann abhängig vom Lösungsmittel. Die Farbänderung ist dabei die Folge einer Dissociation oder Polymerisation der Moleküle des Farbkörpers, wobei sich die Atomkomplexe in tautomere aber hinsichtlich ihrer Konstitution differente Verbindungen teilweise umlagern, von denen die eine Art überwiegt und damit den Farbton bestimmt. Wenn es sich aber in diesem Falle nur um eine Lösung des Farbstoffs in einer Zellsubstanz handelte, so müsste das in Alkohol leicht lösliche Spritblau durch das im Ueberschuss vorhandene Entfärbungsmittel ausgeschwemmt werden, selbst wenn der Farbstoff in der Zellsubstanz noch besser löslich sein sollte als im Alkohol. Denn ein in zwei Medien verschieden stark lösliches Salz wird in beiden bei gleicher Menge entsprechend seiner Löslichkeit verteilt. Ist nun aber die Menge des einen Mediums unvergleichlich viel grösser als die des anderen — wie es bei dem Verhältnis von

angewandtem Alkohol und der Zellsubstanz der Fall ist — so könnte in dem in ganz geringen Mengen vorhandenen Medium nur eine minimale Spur von Farbstoff, die praktisch gleich null ist, zurückbleiben. Das ist hier aber durchaus nicht der Fall. Die Zelle bleibt intensiv gefärbt. Warum bleibt aber der Farbstoff so fest haften? Enge oder weite Intermicellarräume, grössere oder geringere Absorptionskraft oder Permeabilität kommen doch bei einer Lösung garnicht in Betracht. Das Zurückhalten des Farbstoffes kann demnach nur die Folge einer chemischen Verankerung sein. Es gehen offenbar die verschiedenen Umlagerungsprodukte des Farbstoffes durch Vermittlung des Jods Verbindungen mit bestimmten Zellsubstanzen ein, wobei der rote Anteil nur in dem einen Teil der Zellen, der blaue aber nur in anderen Individuen des Ausstrichs gebunden wird, während der nicht verankerte Farbstoff ausgeschwemmt wird. Was nun der Grund für das chemisch verschiedene Verhalten der einzelnen Individuen derselben Pilzart ist, ist nicht ganz klar. Es liegt nahe, anzunehmen, dass die roten vielleicht ältere, schon früher abgestorbene oder degenerierte Individuen sind oder umgekehrt. Man könnte nur noch an eine Verunreinigung des Spritblaus mit Spuren eines ihm nahe verwandten roten Farbstoffes, etwa Fuchsin oder Rosanilin denken. Aber dieser Einwand ist wohl auszuschliessen, weil selbst bei Zusatz einer grösseren Menge einer dieser Verbindungen der Anteil der rotgefärbten Stäbchen nicht grösser wird, während doch,

wenn es sich um ein elektives Verhalten handelte, zu erwarten wäre, dass alle Individuen den besondere Avidität zu ihnen besitzenden Bestandteil annehmen müssten, sobald er in hinreichend grosser Menge vorhanden ist. Zur Feststellung dieser Tatsache wurden Ausstriche von Diphtheriebazillen mit einem Gemisch von 10 ccm Spritblau + 6 Tropfen Rosanilin oder Fuchsin gefärbt, jodiert und mit Alkohol extrahiert.

Nachdem somit die Ergebnisse färberischer Methoden höchst wahrscheinlich gemacht haben, dass das Wesen der Gramfestigkeit in einer chemischen Reaktion zu suchen ist, wäre es zur Erbringung des Beweises noch nötig, das Vorhandensein einer Zellsubstanz nachzuweisen, an die die Gramfestigkeit gebunden ist. Die Existenz eines solchen Körpers wurde vielfach angenommen und gleichzeitig versuchte man, über die Natur einer solchen „Gramsubstanz" Aufschluss zu bekommen. Doch gelang es nur Aronson, bei den Tuberkelbazillen zu zeigen, dass mit der Entfernung eines Lipoids durch Trichloräthylen auch die Gramfestigkeit schwindet. Andere Autoren sprechen nur mehr oder weniger durch Experimente gestützte Vermutungen über die chemische Zusammensetzung dieses eigenartigen Zellenbestandteils aus.

So ist Weiss der Meinung, die Gramsubstanz bestehe grösstenteils aus Eiweiss, doch sei dabei noch ein anderer Bestandteil wichtig, der ihr die Resistenz gegen Chemikalien verleihe. Much und Deycke vertreten auch die Ansicht, dass Eiweiss ihr Haupt-

bestandteil sei, doch spielen Neutralfette eine wichtige Rolle dabei. Cederncreutz steht auf dem Standpunkt, dass der Gramkörper aus Eiweiss, Stärke, Fett und Hemicellulose besteht. In neuester Zeit gelang es Tamura, aus Tuberkelbazillen eine Substanz, das Mykol, zu isolieren, die sich als säure- und gramfest erwies. Die Analyse ergab, dass es sich um einen höheren Alkohol von der Formel $C_{24}H_{56}O$ handelte.

Ganz im Gegensatz dazu ist Nikitine der Meinung, dass Substanzen, die Fette zu extrahieren vermögen, die Gramfestigkeit nicht herabsetzen können. Doch soll es durch Säuren und Ammoniak bei mehreren Bakterien gelingen, ihre Färbbarkeit nach Gram aufzuheben. Ueber eine noch andere Beeinflussbarkeit der Gramreaktion berichtet Braem. Nach ihm sollen Staphylokokken, in destiliertem Wasser aufgeschwemmt, mit zunehmendem Alter gramnegativ werden. Paltauf konnte zeigen, dass durch Müller'sche Flüssigkeit, Osmiumsäure und Alkohol gewisse gramnegative Spaltpilze gramfest zu machen sind.

Demnach gelang es schon wiederholt, die Gramfestigkeit im einen oder anderen Sinne zu beeinflussen, doch war dies Nikitine, Braem und Paltauf nur durch solche Mittel möglich, die sicher die verschiedensten Bakterienbestandteile angreifen und die ganze Struktur der Zelle verändern. Man kann daher aus diesen Versuchen keinen eindeutigen Rückschluss auf die Existenz oder gar auf die chemische Natur einer Gramsubstanz machen.

Da Aronson und Tamura der Anwesenheit eines Lipoids eine mehr oder weniger grosse Wichtigkeit für die Gramreaktion zuschreiben, lag es nahe, Versuche in dieser Richtung anzustellen. Das Entscheidende dabei war, zu untersuchen, ob es möglich ist, durch ein Mittel, das Lipoide löst, den Bakterien ihre Färbbarkeit nach Gram zu nehmen.

Zu diesem Zweck wurde der Bacillus anthracis mit Alkohol, Aether, Chloroform, Xylol, Benzin, Benzol, Aceton, Tetrachloraethylen, Toluol und Anilin extrahiert.

Die dabei befolgte Technik war folgende: Aufschwemmungen in physiologischer Kochsalzlösung von auf Agar gezüchteten Milzbrandbazillen wurden scharf zentrifugiert. Nach Abgiessen des überstehenden Wassers wurden wiederum einige Tropfen physiologischer Kochsalzlösung zugesetzt, bis eine dickflüssige, noch eben giessbare Masse entstand. Diese liess sich durch Umgiessen leicht in kleine circa 6 cm hohe Spitzgläschen verteilen und wurde dann von neuem stark zentrifugiert. Die wenige danach überstehende Kochsalzlösung konnte am besten mit einer Capillare abgesaugt werden. Die Gläschen wurden danach mit der zur Extraktion bestimmten Flüssigkeit gefüllt und mit Gummistopfen verschlossen. Hierbei zeigte sich eine die lipoidlösende Wirkung sehr beeinträchtigende Erscheinung. Die Bakterien mischten sich nämlich mit den meisten Kohlenwasserstoffen, selbst bei starkem Schütteln, nicht sondern klebten in kleinen Klumpen oder in einer dünnen Schicht

an der Glaswand. Dies ist wahrscheinlich der Grund für die etwas unregelmässigen färberischen Erfolge. Nach 4—10tägiger Brutschrankbehandlung bei 37° wurden die Bakterien wieder abzentrifugiert und dann mit Glycerineiweiss auf Deckgläschen ausgestrichen.

Der färberische Erfolg war der, dass es nach 4tägiger Brutschrankbehandlung mit Aceton, Xylol, Benzin, Benzol und Tetrachloräthylen gelang, dem Anthrax teils vollkommen, teils unter Zurücklassung grampositiver Reste seine Gramfestigkeit zu nehmen. Die Probe darauf wurde durch die Originalmethode nach Gram gemacht, wobei aber Acetonalkohol zur Entfärbung angewandt wurde, nachdem festgestellt war, dass unvorbehandelte Bakterien dabei den Farbstoff vollkommen festhalten. Ein Sinken der Gramfestigkeit ist nämlich durch dieses stärkere Extraktionsmittel leichter festzustellen. Ausserdem wurden Färbungen nach Much und Weiss vorgenommen. Das Sonderbare dabei war, dass die Färbbarkeit nach der einen oder anderen dieser drei Methoden meist ganz verschieden stark herabgesetzt war, wobei man beobachten konnte, dass manchmal besonders der durch Rosanilin und ein andermal wieder der durch Pararosanilin färbbare Anteil mehr geschwunden zu sein schien. So zeichnete sich besonders die Xylolbehandlung dadurch aus, dass das Fuchsin danach fast garnicht mehr gehalten wurde, während nach der Extraktion mit Tetrachloräthylen von Pararosanilin fast nichts mehr zu sehen war. Ueber die wechselnden färberischen Resultate

Tabelle I Milzbrandbacillen.

4 Tage behandelt mit	Gram mit Fuchsin als Kontrastfärbung	Much	Weiss	Zusammenfassung
Aceton	Alle fast vollkommen homogen dunkelviolett	Grösster Teil dunkelviolett, ein kleiner Teil hellviolett.	Gleichmässig schmutzig dunkelrot von geringer Intensivität mit violettem Schimmer.	Festigkeit für Gram und Much fast nicht geschädigt, doch wird das Farbgemisch (weiss) schlecht gehalten
Anilin	Fast alle sind kräftig rot	Fast alle homogen dunkelviolett.	Gleichmässig dunkelrot mit violettem Schimmer.	Färbbarkeit nach Gram aufgehoben. Much nicht geschädigt. Bei Weiss fehlen die Granula.
Benzin	Grösster Teil rot. Andere ganz farblos.	Fast alle homogen dunkelviolett.	Bei den meissten noch reichlich violette Reste. Stets fehlt der rote Farbstoff. Viele ganz farblos.	Färbbarkeit nach Gram und das Haften des Fuchsins bei Weiss stark herabgesetzt. Much unversehrt.
Benzol	Fast alle rot. Andere haben violette Reste, viele farblos.	Fast alle homogen dunkelviolett.	Teilweise schwachrot mit violettem Schimmer. Die übrigen haben roten Leib mit violetten Granulis.	Färbbarkeit nach Gram fast ganz aufgehoben, nach Weiss stark herabgesetzt. Much unversehrt.
Xylol	Fast alle rot oder farblos. Kleiner Teil hat violette Reste.	Starke violette Reste. Viele wie angenagt.	Es fehlt der rote Farbstoff fast vollkommen. Deutliche violette Reste.	Gram fast ganz aufgehoben. Pararosanilin bei Much und Weiss gut gehalten. Fuchsin schlecht.
Tetrachloräthylen	Ebenso wie bei Xylol.	Pararosanilin fehlt fast vollkommen.	Homogen hellrot. Vereinzelte, winzige violette Reste.	Pararosanilin überall nur noch in Spuren. Rosanilin haftet bei Weiss gut.

kann man sich am besten durch eine Tabelle einen Ueberblick verschaffen. (Siehe Tabelle I.)

Es ist nach diesen Ergebnissen wohl nicht anzuzweifeln, dass die Gramfestigkeit beim Anthrax an die Gegenwart eines Lipoids gebunden ist. Ja die hier gefundenen Tatsachen erlauben sogar noch weitergehende Einblicke in die Natur dieser Gramsubstanz. Sie sprechen nämlich sehr im Sinne einer Vielheit von Lipoiden im Anthrax, die unter Vermittlung des Jod eine Bindung mit einem Amidophenylmethan-Farbstoff einzugehen imstande sind. Denn nur dann, wenn jeder Farbkörper für sich an einer besonderen Substanz der Zelle verankert ist, kann es vorkommen, dass der eine an Bindungskraft eingebüsst hat, während der andere noch fest haftet.

Doch noch ein anderer Umstand ist hier von Wichtigkeit. Viele Individuen der mit diesen Extraktionsmitteln, abgesehen vom Aceton und Anilin, behandelten Grampräparate waren trotz der Kontrastfärbung mit Fuchsin vollkommen farblos. Das deutete auf eine Schädigung der Färbbarkeit der Zelle im ganzen und nicht nur auf eine Herabsetzung ihrer Gramfestigkeit. Um einigen Aufschluss über die Wirkung dieser Mittel auf die Farbbindung in der Bakterienzelle, soweit sie offenbar nicht an die Anwesenheit von fettähnlichen Stoffen gebunden ist, zu erhalten, wurde der gramnegative Paratyphus einer viertägigen Behandlung mit Xylol, Benzin, Benzol und Tetrachloräthylen unterzogen. Es zeigte sich danach, dass auch er in seiner

Färbbarkeit mit Karbolfuchsin geschädigt war, denn die damit circa 10 Sek. behandelten Präparate waren nur schwach rot. Da nun kaum andere als fettähnliche Körper durch diese Mittel extrahiert und zerstört werden, so liegt die Vermutung nahe, dass auch bei Gramnegativen Lipoide auf das Haften der Farbstoffe von Einfluss sind, dass bei ihnen aber noch eine andere Substanz, an der eine Verankerung des Farbstoffs möglich ist, existiert. Diese ist aber durch lipoidlösende Mittel nicht angreifbar. Beim Milzbrand dagegen scheint, wenn man die Farblosigkeit vieler Stäbchen trotz der Kontrastfärbung in Betracht zieht, die Farbbindung in toto an Lipoide gebunden zu sein, während wahrscheinlich eine Verankerung des Farbkörpers an anderen, in diesen Kohlenwasserstoffen nicht löslichen Zellbestandteilen in wesentlicher Menge nicht stattfindet.

Nachdem sich also dieses Extraktionsverfahren beim Anthrax als erfolgreich erwiesen hatte, wurde es noch auf andere Grampositive ausgedehnt. Zunächst wurde ein anderes Bakterium, das hinsichtlich seiner Färbbarkeit mit den hier verwandten Modifikationen der Grammethode dem Milzbrand nahe steht, der Diphtheriebazillus, 4 Tage mit Xylol, Benzin, Benzol, Anilin und Tetrachlorätylen ebenso wie der Anthrax behandelt. Auch hier gelang es mit allen angewandten Kohlenwasserstoffen, den Diphtherieerreger in ein gramnegatives Stäbchen zu verwandeln. Ein auffallender Unterschied vom Anthrax bestand aber darin, dass alle

Tabelle II Diphtherie-Bakterien.

4 Tage behandelt mit:	Gram mit Acetonalkohol entfärbt	Much mit Fuchsin als Kontrastfärbung	Weiss	Zusammenfassung
Xylol	Fast alle vollkommen rot. Vereinzelte zeigen violette Reste.	Grösster Teil rot. Ein kleiner Teil hat an einem Ende kolbenförmige violette Reste.	Schwach bläulich-roter Körper mit nur schlecht sich abhebenden reichlichen violetten Resten.	Besonders ist die Bindung der Pararosaniline bei der Gram- und Muchmethode geschädigt; bei Weiss haftet es besser als das Fuchsin.
Benzin	Bei weitem grösster Teil rot. Der Rest zeigt am einen Ende eine kolbenförmige violette Auftreibung.	Grösster Teil ist vollkommen rot. Die andern haben violette Reste teils als Körnchen, teils in mehr diffüser Form.	Körper rötlich violett mit reichlichen körnchenförmigen violetten Einschlüssen.	Aufhebung der Färbbarkeit nach Gram und starke Beeinträchtigung der nach Much. Störung der Farbbindung nach Weiss.
Benzol	Ebenso wie bei Benzin.	Teils vollkommen rot, teils mit violetten kolbenförmigen Resten an einem Ende.	Rotvioletter Leib mit schlecht sich abhebenden violetten Resten.	Färbbarkeit nach Gram aufgehoben und nach Much stark herabgesetzt. Bei Weiss scheint das Fuchsin gut zu haften.
Anilin	Ebenso wie bei Benzin.	Bei weitem grösster Teil rot. Nur kleiner Teil hat an einem Ende eine violette kolbenförmige Auftreibung.	Gleichmässig rötlich violett. Gelegentlich mit undeutlich sich abhebenden violetten Einschlüssen.	Aufhebung der Färbbarkeit nach Gram und ebenso fast vollkommen der nach Much. Beide Farbstoffe werden bei Weiss schlecht gehalten.
Tetra chloräthy	Alle sind vollkommen rot	Fast alle rot. Gelegentlich mit undeutlichen violetten Resten.	Körper hell rötlich violett mit Granulis von derselben Farbe in dunklerem Farbton.	Pararosaniline werden fast nicht mehr gehalten. Nur bei Weiss scheint es in Spuren dem Fuchsin beigemischt.

Exemplare das zur Kontrastfärbung benutzte Fuchsin in ausgiebiger Weise festhielten. Nur die Gramfestigkeit war bei der grössten Zahl vollkommen aufgehoben, bei wenigen waren kleine violette Reste zurückgeblieben. Hier ist also mit Sicherheit die Gramreaktion von dem Vorhandensein eines anderen Zellbestandteils als die Färbbarkeit mit Anilinfarben überhaupt abhängig. Wie beim Anthrax so zeigen auch hier die verschiedenen Extraktionsmittel eine verschieden ausgedehnte Schädigung der Färbungen nach Much und Weiss. Am besten verschafft man sich durch eine Tabelle einen Ueberblick über diese Resultate (Tabelle II.)

Auch in diesem Fall ist man wohl berechtigt, aus der wechselnden Schädigung der einen oder anderen Färbungsmethode durch die einzelnen lipoidlösenden Substanzen auf eine Mehrheit von Lipoiden zu schliessen, an die sich die einzelnen Farbkörper verankern können.

Ganz im Gegensatz zu diesen mit den grampositiven Stäbchen gewonnenen Resultaten hatte Aronson behauptet, dass die Gramfestigkeit im allgemeinen nicht an die Anwesenheit von Lipoiden gebunden sei, sondern dass dies nur beim Tuberkelbazillus zutreffe. Bei Strepto- und Staphylokokken gelang es ihm nämlich trotz zweitägiger Behandlung mit Trichloräthylen nicht, die Gramfestigkeit aufzuheben. Gestützt auf obige Ergebnisse jedoch wurden Staphylokokken einer 4tägigen Einwirkung von Xylol, Anilin, Benzin und Tetrachloräthylen ausgesetzt. Ganz im Gegensatz zu ihrer Kleinheit, aus der man wohl auf eine schnelle Extraktion

schliessen durfte, bewiesen sie eine grössere Resistenz diesen Mitteln gegenüber als die Stäbchen. Denn nur mit Anilin und Tetrachloräthylen, die auch bei den vorigen Versuchen die intensivste Wirkung gezeigt hatten, gelang es, ihre Gramfestigkeit aufzuheben. Gleichzeitig beweist dieser Unterschied in der Löslichkeit die Verschiedenheit der Lipoide der Staphylokokken und der übrigen geprüften Bakterien. Die Probe auf die Gramfestigkeit wurde hier nur mit der Originalmethode nach Gram angestellt unter Verwendung von Acetonalkohol als Entfärbungsmittel. Eine differenzierte Darstellung der Kokken nach Much und Weiss ist, wie gesagt, nicht möglich.

Schliesslich wurde auch noch der Tuberkelbazillus dem Extraktionsverfahren unterworfen. Da bei ihm wegen des Reichtums an Lipoiden von vornherein eine langsamere Extraktion zu erwarten war, wurde er 10 Tage mit Xylol, Benzin, Benzol, Anilin und Tetrachloräthylen behandelt. Diesmal erwiesen sich alle Mittel ausser dem Tetrachloräthylen als unwirksam, das allein die Färbbarkeit nach Gram, Much und Weiss aufhob. Bei den übrigen konnte der Tuberkuloseerreger mit allen genannten Methoden dargestellt werden, ohne dass eine Abweichung von der Norm zu bemerken war. Es stimmt also dies Resultat durchaus mit der von Aronson gefundenen Tatsache überein.

Bei allen untersuchten Bakterienarten war es demnach möglich, durch Tetrachloräthylen die Gramfestigkeit aufzuheben, während Erfolge mit Xylol, Benzin,

Benzol und Anilin nicht bei allen Spaltpilzen und dann auch in wechselndem Masse bezüglich der einzelnen Färbungsarten zu verzeichnen waren. Der entscheidende Einfluss eines Lipoids auf die Gramfestigkeit dürfte damit ausser Zweifel stehen. Weiterhin ist man aber aus diesen Resultaten gewiss zu schliessen berechtigt, dass die Gramsubstanz überhaupt oder doch wenigstens ihr integrierender Bestandteil kein einheitlicher Körper ist, sondern ein je nach der Pilzart verschieden zusammengesetztes Gemisch von Lipoiden. Die chemische Auffassung der Gramreaktion dürfte mit dieser Feststellung vollkommen gerechtfertigt sein. Und ihr gliedert sich zwanglos die Tatsache von der Brauchbarkeit einer ganzen Farbgruppe zur Gramfärbung an, deren einzelne Glieder einen gemeinsamen chemischen Charakter tragen. Zusammenfassend muss die Gramreaktion demnach bezeichnet werden als eine Bindung von Amidophenylmethanen an Lipoide gewisser Bakterien unter Vermittlung des Jods, die so fest ist, dass sie durch Säuren und Alkohol nicht gelöst werden kann.

Zusammenfassung.

Bei dem lebhaften Interesse, das in letzter Zeit die Gramfärbung erregt, und bei der Fülle verschiedener Meinungen über das Wesen dieser wichtigen Farbreaktion verlohnt es sich vielleicht zur Erlangung eines

besseren Ueberblickes über obige Ergebnisse, die in wesentlichen Punkten von den früheren Anschauungen abweichen, die Hauptsachen kurz zusammenzufassen. Aus Unnas Ansicht, dass nur Pararosaniline eine alkoholfeste Jod-Protoplasmaverbindung einzugehen imstande sind, während die Jod-Rosanilinverbindung durch Alkohol gelöst würde, hatte man allgemein den Schluss gezogen, dass nur die Pararosaniline zur Gramfärbung brauchbar seien, die Rosaniline aber nicht. Bei einer Nachprüfung der Resultate Unnas stellte sich jedoch heraus, dass auch jodierte Rosaniline bedeutend alkoholfester sind als unjodierte. Auffallenderweise ergaben sogar ebensolche Untersuchungen mit anderen verwandten Verbindungen, dass auch bei ihnen, nämlich den Malachitgrünfarben und dem Auramin, eine festere Verankerung durch Jodwirkung in der Zelle stattfindet. Somit müssen alle drei Farbstoffgruppen als zur Gramreaktion geeignet bezeichnet werden.

Ebensowenig wie in diesem Punkte war es möglich, sich der Ansicht Unnas über die Darstellbarkeit des Tuberkelbazillus durch jodierte Pararosaniline und Rosaniline anzuschliessen. Denn Versuche mit diesen Farbstoffen am Tuberkuloseerreger führten zu dem seinen Anschauungen entgegengesetzten Ergebnis, dass beide Farbstoffgruppen jodiert mehr die Granulastruktur der Koch'schen Stäbchen, unjodiert aber mehr ihre Bakterienform zur Geltung bringen. Diesem Verhalten schlossen sich wieder die Malachitgrünfarben und das Auramin vollkommen an.

Eigenartige Ergebnisse zeitigte ferner das Studium der einzelnen Pararosanilinsalze bei dem Verfahren nach Much und Weiss. Denn wenn sie sich auch ganz gleichwertig bei der Gramfärbung verhielten, so war doch von einer Uebereinstimmung nichts mehr zu merken, sobald man sie bei diesen Modifikationen der Grammethode anwandte. Nicht weniger unerwartete Eigenschaften bewies auch das Fuchsin bei der Weiss-Färbung, das hier eine das Pararosanilin weit übertreffende Bindungskraft zeigte.

Ueber das Wesen der Gramfärbung teilen sich die Meinungen in zwei Richtungen. Die einen sehen in der Gramreaktion einen physikalischen, die anderen einen chemischen Prozess. Es gelang nun, rein färberisch eine Reihe von Tatsachen aufzufinden, die einerseits die physikalischen Erklärungen und besonders die Eisenbergs unhaltbar machen, andererseits aber eine chemische Bindung des Farbstoffes als höchst wahrscheinlich erweisen. Eine vollkommene Stütze erhielt die chemische Auffassung durch den Nachweis einer Zellsubstanz, an die die Gramfestigkeit gebunden ist.

Bevor ich meine Arbeit schliesse, möchte ich nicht versäumen, Herrn Professor Dr. Hermann Kossel für seine gütige Hilfe und wertvollen Ratschläge, die er mir jederzeit zuteil werden liess, meinen ergebensten Dank zu sagen.

Literaturverzeichnis.

Gram, Ueber die isolierte Färbung von Schizomyceten in Schnitten und Trockenpräparaten. (Fortschritte der Medizin 1884 Bd. 2).

Unna, Rosaniline und Pararosaniline. (Monatshefte für Dermatologie, Ergänzungsheft 1887).

Eisenberg, Ueber das Ektoplasma und seine Veränderungen im infizierten Tier. (Centralbl. für Bakteriologie, Bd. 49, 1909).

Grimme, Die Gramsche Methode der Bakterienfärbung. (Centralbl. für Bakteriologie Bd. 32, 1902).

Brudney, Ueber die Beziehungen der Bakterien usw. (Centralblatt für Bakteriologie Bd. 21, 1908 p. 62).

Aronson, zur Biologie der Tuberkelbazillen (Berl. Klin. Wochenschrift 1910 Nr. 35).

Tamura, Zur Chemie der Bakterien (Hoppe Seylers Zeitschrift f. physiologische Chemie Bd. 87, 1913 Heft 2).

Cederncreutz, Studien über die Bedingungen des positiven oder negativen Ausfalls der Gramfärbung bei einigen Bakterien (Archiv f. Dermatologie und Syphiis Bd. 93, 1908).

Bittrolf u. Momose, Beiträge zur Frage des granulären Tuberkulose-Virus (Veröffentl. der Robert Koch-Stiftung 1913, Heft 4).

Kruse, Mikrobiologie 1910 Kap. I, § 18.

Fischer, Färbung, Fixierung und Bau des Protoplasmas 1899.

Weiss, Zur Morphologie des Tuberkulosevirus unter besonderer Berücksichtigung einer Doppelfärbung. (Berl. Klin. Wochenschrift 1909, Nr. 14).

Deycke und Much, Ueber einige strittige Punkte in der Biologie der Tuberkelbazillen (Berl. Klin. Wochenschr. 1910 Nr. 42).

Deycke, Zur Biochemie der Tuberkelbazillen (Münchener Med. Wochenschrift 1910. Nr. 19).

Ehrlich, Encyklopädie der mikroskopischen Technik.

Nikitine, (Jahresberichte über die Fortschritte der Lehre von den pathogenen Migroorganismen von Baumgarten 1898 p. 783) Referat.

Braem, Untersuchungen über die Degenerationserscheinungen pathogener Bakterien im destillierten Wasser. (Zieglers Beiträge zur pathologischen Anatomie und allgemeinen Pathologie).

Paltauf, Wiener Klin. Wochenschr. 1891 und 1892.

Lebenslauf.

Als Sohn des Kaufmanns Franz Reichert und seiner Frau Klara, geborene Schneider, wurde ich, Hermann, Paul, Fritz Reichert, 1887 zu Friedeberg i. N. geboren. Ich bin preussischer Staatsangehöriger. Den ersten Schulunterricht erhielt ich durch einen Hauslehrer, bis ich 1901 auf das Kgl. Commenius-Gymnasium zu Lissa Bz. Posen kam, wo ich Ostern 1908 die Reifeprüfung bestand. Meine medizinischen Studien begann ich in Breslau und diente dort auch während des ersten Semesters mein erstes Militärhalbjahr ab. Im 2. Semester ging ich nach Berlin und kam dann nach Heidelberg, wo ich 3 Semester blieb. Danach studierte ich 2 Semester in München und die letzten 3 wieder in Heidelberg. Dort hatte ich auch Ende Juli 1910 die ärztliche Vorprüfung und im Frühjahr 1913 das Staatsexamen bestanden.